

1115

"PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE
Serratia rubidaea CCT 5732 EM ÓXIDO MISTO DE SÍLICA-
TITÂNIA".

Refere-se o presente relatório

5 a uma Patente de Invenção que está relacionada ao campo da
imobilização de enzimas e células microbianas que é um se-
tor da biocatálise com ampla aplicação industrial devido a
maior facilidade de armazenamento e vida útil do biocatali-
sador. As reações realizadas com enzimas e microrganismos

10 suportados apresentam vantagens sobre as condições tradicio-
nais (não suportadas), pois são mais facilmente processa-
das, permitem processos contínuos e diminuem o número de
operações unitárias necessárias nas indústrias. Neste con-
texto é necessário haver uma compatibilidade entre o supor-

15 te e o biocatalisador de forma que o número de células viá-
veis por unidade de volume seja alta e que a atividade das
enzimas de interesse continuem com igual eficiência do pon-
to de vista da biotransformação. Assim a pesquisa e o de-
senvolvimento de novos suportes e de métodos para imobili-

20 zação com a finalidade de melhorar o desempenho e a produ-
tividade dos biocatalisadores para transformações específi-
cas é uma área de grande interesse biotecnológico. As ca-
racterísticas essenciais são a área superficial, a estabili-
dade mecânica do suporte, além da viabilidade econômica [1].

25 A presente patente de invenção
focaliza a immobilização da *Serratia rubidaea* CCT 5732 na
superfície da matriz Sílica-Titânia ($\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$) preparada
pelo processo sol-gel que permite obter materiais com alta

homogeneidade, pureza, porosidade controlada, e partículas bem modeladas [2], aumentando a vida útil do biocatalisador sem alterar a sua atividade biocatalítica.

Atualmente os métodos usuais
5 de imobilização são baseados em quatro técnicas alternativas: aprisionamento em matriz polimérica, adsorção em superfície, ligação covalente em suportes sólidos insolúveis em água e ligação química cruzada com reagentes bifuncionais. Devido ao alto grau de variabilidade individual in-
10 rente aos sistemas biológicos não existe um método genérico e ideal para todo o universo dos microrganismos e reações de interesse.[3].

A seleção do material suporte e do método de imobilização é feita ponderando as várias
15 características e os aspectos práticos necessários para aplicação da enzima e ou célula microbiana versus as propriedades, limitações e características dos métodos de imobilização e do suporte [3].

Na imobilização por aprisiona-
20 mento em matriz polimérica as moléculas das enzimas/células não estão livres em soluções, seu movimento é restrito pela estrutura cristalina do gel. Este método é limitado a enzimas isoladas previamente estabilizadas ou altamente estáveis e células microbianas que não estejam em crescimento.

25 Os métodos gerais de aprisionamento são: 1) Gelificação ionotrópica de macromoléculas com cátions multivalentes (alginatos); 2) Gelificação induzida por temperatura (agarose, gelatina); 3) Polimerização

orgânica por reações químicas e ou fotoquímicas (poliacrilamida); e 4) Precipitação a partir de solventes imiscíveis (poliestireno).

5 A ligação covalente em suportes sólidos insolúveis em água envolve a formação de uma ligação covalente entre a enzima e ou célula e o material suporte. A ligação é normalmente formada entre os grupos funcionais que fazem parte dos resíduos de aminoácidos na superfície da enzima, freqüentemente representados por grupo
10 po amino (NH_2) da lisina ou arginina, grupo carboxílico (CO_2H) do ácido aspártico ou ácido glutâmico, o grupo hidroxila (OH) da serina ou treonina e o grupo sulfidrila (SH) da cisteína.

Os materiais de suporte usualmente utilizados são: celulose, dextranas (Sephadex), amido, agarose (Sephарose). Os polissacarídeos são suportes susceptíveis à degradação pelos microrganismos, e danos provocados pelos solventes orgânicos. Outros suportes utilizados para imobilização são sílica porosa e vidros porosos.
20 A sílica porosa consiste de pequenas partículas esféricas fundidas que apresentam microcavidades, pequenos canais, alta resistência e durabilidade. O vidro de borossilicato sinterizado deve ser temperado para formar um sistema de canais uniformes, este suporte também é durável e resistente à degradação microbiológica ou danos provocados por
25 solvente.

Ao escolher o método de imobilização através de ligação covalente deve se ter o cuidado

na escolha dos grupos funcionais reativos do suporte para que os mesmos não inativem o processo ligando-se quimicamente aos amino-ácidos do sítio ativo.

A ligação cruzada é livre de
5 suporte e envolve a ligação de células ou de enzimas entre si para formar uma estrutura complexa tridimensional grande, e pode ser obtida através de métodos químicos ou físicos. Os métodos químicos de ligação cruzada normalmente baseiam-se na formação de ligação covalente entre as células
10 através de reagentes tais como glutaraldeído e diisocianato de tolueno. Entretanto, a toxicidade de tais reagentes é um fator limitante a aplicação desta metodologia para células microbianas e muitas enzimas.

O método físico normalmente
15 utilizado é a floculação, formando partículas com alta densidade celular. Os agentes floculantes, tais como poliaminas, polietilenoimina, poliestirenos sulfonados e vários fosfatos são extensivamente utilizados e bem caracterizados. A ligação cruzada é raramente usada como único meio de
20 imobilização devido a ausência de propriedades mecânicas e baixa estabilidade que são limitações severas, ela é mais freqüentemente empregada para melhorar outros métodos de imobilização, normalmente por reduzir as perdas celulares que possa ocorrer em outros sistemas.

25 A imobilização por adsorção é o método mais simples e envolve interações de superfície reversíveis entre enzima/célula e o material suporte. As forças envolvidas são principalmente atrações eletrostáti-

cas, tais como forças de van der Waals, interações iônicas, ligações de hidrogênio, embora ligações hidrofóbicas possam ser significantes. Estas forças são fracas, mas suficientemente importantes em número para fornecer uma ligação razoável. Nenhuma ativação ou modificação química é necessária durante o processo de adsorção, e normalmente nenhum dano é feito para as enzimas e ou células.

A seguir o presente invento será pormenorizadamente descrito com referência as figuras abaixo relacionadas, nas quais:

a figura 1 ilustra em "A" e "B", vistas de microscopia de varredura (tensão de aceleração de 15 Kev), onde "A" representa uma micrografia do $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$; e "B" representa uma micrografia da bactéria *Serratia Rubidaea* imobilizada no $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$;

a figura 2 ilustra um cromatograma gasoso em coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária quiral heptakis-(2,6-me-til-3-pentil)- β -ciclodextrina do β -ce-to-éster 1;

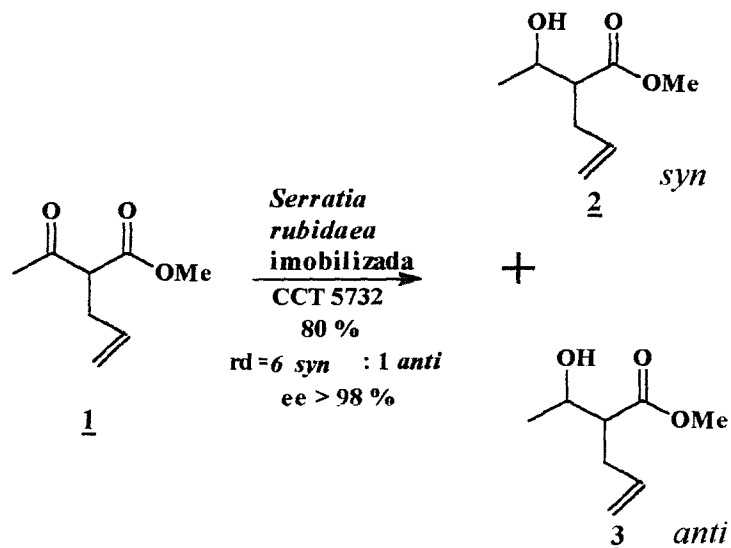
a figura 3 ilustra um cromatograma gasoso em coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária quiral heptakis-(2,6-metil-3-pentil)- β -ciclodextrina do álcool racêmico; e

a figura 4 ilustra um cromatograma gasoso em coluna capilar de sílica fundida com

A *Serratia rubidaea* CCT 5732

foi inoculada em meio nutriente líquido apropriado (100 mL) em erlenmeyer (500 mL) e mantido em agitador rotatório (120 rpm), 28°C por 72h. Após este período de crescimento, foi
5 centrifugada a 5000 rpm por 30 min, a biomassa resultante, (ca 1,2 g) foi transferida para um erlenmeyer (250 mL) contendo água destilada estéril (50 mL) e óxido binário SiO₂/TiO₂ previamente esterilizado (0,6 g). O sistema foi agitado a 120 rpm e mantido a 28 °C. Após 12 h o sólido foi
10 filtrado em funil de vidro sinterizado.

A imobilização da bactéria foi observada através de análises de microscopia eletrônica de varredura (figura 1) e a atividade biocatalítica através da reação de redução do β-cetoéster 1 (esquema 1) abaixo re-
15 produzido.



Esquema 1: Biotransformação do β-cetoéster 1 com células imobilizadas.

A reação de biotransformação
20 foi realizada em erlenmeyer (125mL) contendo solução tampão fosfato pH 7 (NaHPO₄.7H₂O/KH₂PO₄, 0,1mol.L⁻¹, 25mL), substrato

(20 μL) e células imobilizadas (ca 1,5g) mantido num agitador rotatório a 28 °C e 120 rpm. A reação foi monitorada a cada 12h retirando-se alíquotas (0,5mL), extraíndo o produto da reação com acetato de etila o qual foi seco sob sulfato de sódio, filtradas e analisadas por cromatografia em fase gasosa (CG (FID) HP 5890) utilizando-se coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária quiral hep-takis-(2,6-metil-3-pentil)- β -ciclodextrina [(25m x 0,25mm) x 0,25 μm]. As condições da análise foram: temperatura do injetor e detector 200°C, programação da temperatura: 80°C - 5min - 5°C/min - 180°C - 10min e pressão na cabeça da coluna 0,6 bar.

Uma parte do material imobilizado foi estocado em recipientes estéreis sob refrigeração para testar sua estabilidade e verificar a manutenção da sua atividade biocatalítica após períodos de estocagem (1 semana, 1 mês e 2 meses).

Segue-se abaixo uma descrição detalhada do funcionamento do presente invento.

A tabela 1 mostra o resultado da análise de titânio no óxido binário $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$, obtidos por análise química, esta tabela apresenta também a medida de área superficial específica e o volume médio de poros. Tabela 1: Análise química de titânio no óxido binário, área superficial específica, S_{BET} e volume médio de poros, V_p .

Matriz	Ti/ % em massa	$S_{\text{BET}}/ \text{m}^2.\text{g}^{-1}$	$V_p/ \text{mL}.\text{g}^{-1}$
$\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$	20,3	503	0,35

Uma das maiores motivações para a utilização de suportes porosos, como é o caso do su-

porte em questão, é a obtenção de alta atividade catalítica por unidade de volume do catalisador através do uso de um material suporte com alta área superficial disponível por unidade de volume. Além disso, os substratos podem frequentemente se difundirem nos materiais porosos muito mais rapidamente que dentro de gels ou através de membranas de ultrafiltração, deste modo minimizando a limitação da difusão na velocidade de reação. As moléculas do substrato com tamanhos comparáveis aos da enzima não podem interagir com a enzima imobilizada pelo método de aprisionamento, enquanto tais substratos podem difundir-se, embora lentamente, dentro da estrutura porosa na qual as enzimas estão ligadas [4 - 5].

O resultado obtido de área superficial específica pelo método B.E.T. e o volume médio de poros pelo método de intrusão de mercúrio (tabela 1) para o óxido binário $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ mostrou-nos um material microporoso com uma elevada área superficial. O material submetido à microscopia eletrônica de varredura indicou que o titânio está distribuído uniformemente por todo o material. Esta matriz apresenta alta estabilidade térmica, alta resistência mecânica é atóxica frente a materiais biológicos, tais propriedades fazem dela uma boa candidata para imobilização de células.

Segue-se abaixo uma descrição da imobilização da *Serratia rubidaea* CCT 5732 no Óxido Binário $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ e reação biocatalítica.

De acordo com a literatura [3],

a imobilização metal-quelato é usualmente realizada em água. Os microrganismos imobilizados são preferidos para conversões sequenciais, porque: 1) a célula microbiana contém todo o sistema multienzimático com as estruturas nativas para as bioconversões; 2) a imobilização de células previne a desativação de suas enzimas que pode ocorrer durante o isolamento das mesmas; 3) os produtos de reação são facilmente separados da biomassa; 4) as células continuamente regeneram os fatores endógenos necessários para os biocatalisadores por um longo tempo.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (figura 1), mostram as micrografias da partícula $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ (figura 1A) e da bactéria imobilizada (figura 1B). Podemos observar que a bactéria está adsorvida por toda a matriz (figura 1B), apresentando uma densidade média superficial de $3,9 \times 10^{11}$ células de bactéria por metro quadrado. Sendo que o suporte apresenta uma área superficial de $503 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ a quantidade de células bacterianas no suporte será de 2×10^{14} células por grama de matriz. Observou-se que a matriz Sílica-Titânia não apresenta influência tóxica nas células da bactéria *Serratia rubidaea* e nenhuma alteração na morfologia celular foi verificada após a adsorção.

A imobilização da bactéria em sílica gel, SiO_2 , (área superficial $500 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) e óxido misto de Sílica-Zircônia ($\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2$) não foram bem sucedidas apresentando nenhuma ou baixa adsorção. Concluiu-se que a adsorção da bactéria no suporte do óxido misto de Sílica-

Titânia está associada à interação da bactéria com o metal de transição (Ti) do suporte.

Resultados similares foram obtidos durante a incubação da *Serratia rubidaea* com a matriz SiO₂/TiO₂ em meio nutriente líquido (28 °C, 48 h).

A boa adsorção celular e a não toxicidade facilitou o desenvolvimento da atividade biocatalítica através da redução enantiosseletiva do β-cetoéster 1 (figura 2) monitorada por cromatografia gasosa capilar quiral e o processo demonstrou ser de grande importância prática.

Todas as reações foram controladas por CG/FID e a condição de resolução foi otimizada com um padrão racêmico anti : syn numa proporção 2:1 (figura 3).

A Tabela 2 mostra a comparação dos resultados obtidos da reação biocatalisada com células livres em repouso versus células imobilizadas da *Serratia rubidaea*

Tabela 2: Células livres X células imobilizadas.

	Excesso enanti- omérico	Razão diastereo- isomérica	Conversão	Tempo de reação
Células livres	>98%	4 syn:1 anti	90%	72 horas
Células imobilizadas	>98%	6 syn:1 anti	80%	96 horas
Células imobilizadas após 60 dias de estoca- gem	>98%	6 syn:1 anti	80%	100 horas

A *Serratia rubidaea* CCT 5732 imobilizada no óxido binário SiO₂/TiO₂ converteu o composto 1 para os álcoois 2 e 3 com conversão de 80 % (esquema 1),

com uma diastereosseletividade anti : syn igual a 1:6. O excesso enantiomérico para ambos diastereoisômeros foi superior a 98% (somente um enantiômero foi detectado, Figura 4). Este resultado pode ser explicado como uma resolução cinética com racemização "in situ". O tempo maior de reação e a menor conversão podem ser otimizados por um aumento da quantidade de células suportadas.

As células imobilizadas através desta metodologia são estáveis a estocagem sob refrigeração (60 dias), comprovada através da manutenção da atividade biocatalítica após este período (tabela 2).

O processo de imobilização da *Serratia rubidaea* CCT 5732 é apropriado para a bio redução efetiva de β -cetoéster. Foi observado um incremento significativo da diastereosseletividade em relação às células livres em repouso (razão syn: anti, 4 : 1), com manutenção da enantiosseletividade >98%.

O método de imobilização utilizado não causa danos à célula microbiana, é simples, rápido e economicamente viável.

A bactéria imobilizada apresenta uma boa estabilidade após estocagem em refrigerador (4°C) por um período de 60 dias.

O material suporte possui boas propriedades mecânicas, tolerância a altas e baixas temperaturas e resistência à biodegradação.

Os resultados apresentados abrem novas perspectivas para a aplicação desta reação em

processos contínuos utilizando células imobilizadas em colunas.

Segue-se abaixo a relação das Referências consideradas no contexto do presente invento:

- 5 [1] - G. F. Bieckerstaff, "Immobilization of Enzymes and Cells", Humana Press, Totowa, New Jersey, 1997.
- [2] - J. E. Gonçalves, Y. Gushikem, S. C. de Castro, J. Non-Crystall. Solids, 260 (1999) 125.
- [3] - L. S. Andreeva, A. I. Zakabunin, G. B. Barannik, A.
- 10 V. Simakov, A. A. Kirchanov, React. Kinet. Catal. Lett., 60 (1997) 373.
- [4] - A. Borchert, K. Buchholz, Biotechnol. Bioeng., 26 (1984) 727.
- [5] - K. E. Dennis, D. S. Clark, J. E. Bailey, Y. K. Cho,
- 15 Y. H. Park, Biotechnol. Bioeng., 26 (1984) 892.

REIVINDICAÇÕES

1. "PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE *Serratia rubidaea* CCT 5732 EM ÓXIDO MISTO DE SÍLICA-TITÂNIA", caracterizado pelo fato de compreender a preparação do óxido binário $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ adicionando-se 12,1 mL de solução de HNO_3 $0,85 \text{ mol.L}^{-1}$ em uma solução de 123 mL de etanol e 123 mL de tetraetil-ortossilicato (TEOS), deixou-se esta solução sob refluxo e agitação por 2,5 h à temperatura de 80°C , sendo que a esta solução foi adicionado 487 mL de etanol e 34 mL de tetrabutóxido de titânio (IV) (TBOT); a mistura foi agitada por mais 2 h à temperatura ambiente, e 66,4 mL de solução de HNO_3 $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$ foram adicionados lentamente, sendo que o produto foi deixado em repouso para gelificar; o gel formado foi quebrado e colocado em estufa a 110°C por 24 h, sendo a seguir, o produto triturado e peneirado em peneira de $250 - 75 \mu\text{m}$, permitindo que partículas com diâmetros entre $250 - 75 \mu\text{m}$ fossem selecionadas; em uma outra etapa do presente processo, o óxido binário de $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ foi lavado com solução aquosa de ácido nítrico 1 mol.L^{-1} , depois com água bidestilada e seco na estufa a 60°C por 24 h; o excesso de água foi retirado na linha de vácuo (10^{-5} torr), sendo que, para eliminação da matéria orgânica, a matriz foi calcinada a 500°C com fluxo de ar.

2. "PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE *Serratia rubidaea* CCT 5732 EM ÓXIDO MISTO DE SÍLICA-TITÂNIA", segundo o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato de compreender a inoculação da *Serratia rubidaea* CCT 5732 em meio nutriente líquido apropriado (100 mL) em er-

lenmeyer (500 mL), sendo mantida em agitador rotatório (120 rpm), 28 °C por 72 h sendo que após este período de crescimento, foi centrifugada a 5000 rpm por 30 min, a biomassa resultante, (ca 1,2 g) foi transferida para um erlenmeyer
5 (250 mL) contendo água destilada estéril (50 mL) e óxido binário SiO₂/TiO₂ previamente esterilizado (0,6 g), sendo o sistema agitado a 120 rpm e mantido a 28 °C; após 12 h o sólido foi filtrado em funil de vidro sinterizado.

3. "PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO
10 DE *Serratia rubidaea* CCT 5732 EM ÓXIDO MISTO DE SÍLICA-TITÂNIA", segundo o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato de que a reação de biotransformação é realizada em erlenmeyer (125 mL) contendo solução tampão fosfato pH 7 (NaHPO₄.7H₂O / KH₂PO₄, 0,1 mol.L⁻¹, 25 mL), substrato (20 µL) e
15 células imobilizadas (ca 1,5 g) mantido num agitador rotatório a 28°C e 120 rpm.

4. "PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO
DE *Serratia rubidaea* CCT 5732 EM ÓXIDO MISTO DE SÍLICA-TITÂNIA", segundo o reivindicado em 3, caracterizado pelo
20 fato de que a reação é monitorada em intervalos de 12 h, procedendo-se à retirada de alíquotas (0,5 mL), extraíndo o produto da reação com acetato de etila o qual é seco sob sulfato de sódio, filtradas e analisadas por cromatografia em fase gasosa (CG (FID) HP 5890) utilizando-se coluna ca-
25 pilar de sílica fundida com fase estacionária quiral heptakis-(2,6-metil-3-pentil)-β-ciclodextrina [(25 m x 0,25 mm) x 0,25 µm]; sendo que as condições da análise são: temperatura do injetor e detector 200°C, programação da tempe-

ratura: 80 °C - 5 min - 5 °C/min - 180 °C - 10 min e pressão
na cabeça da coluna 0,6 bar.

FIG. 1 (A)

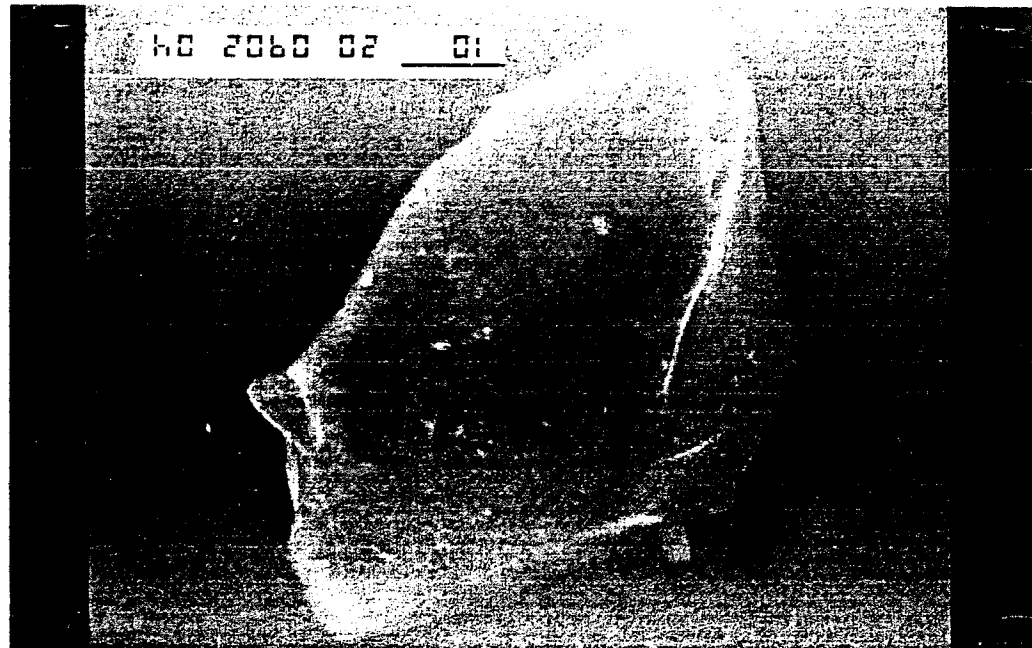


FIG. 1 (B)

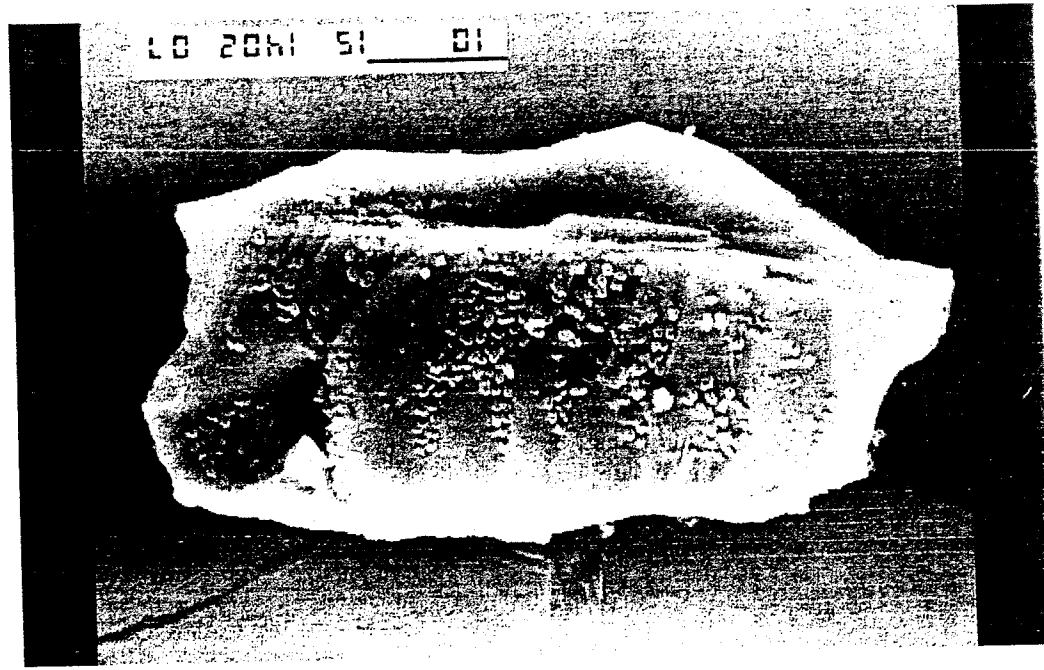
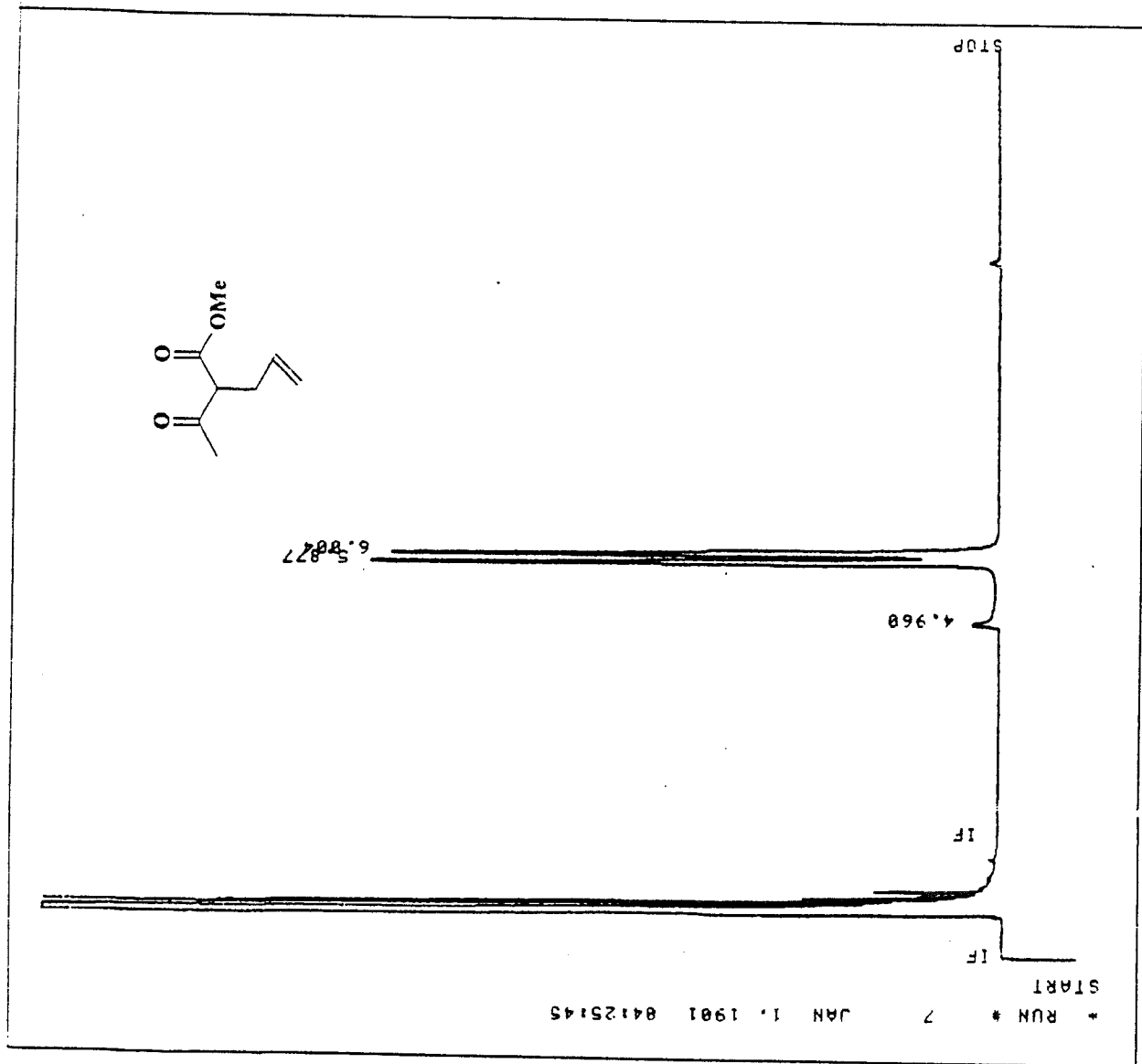


FIG-2



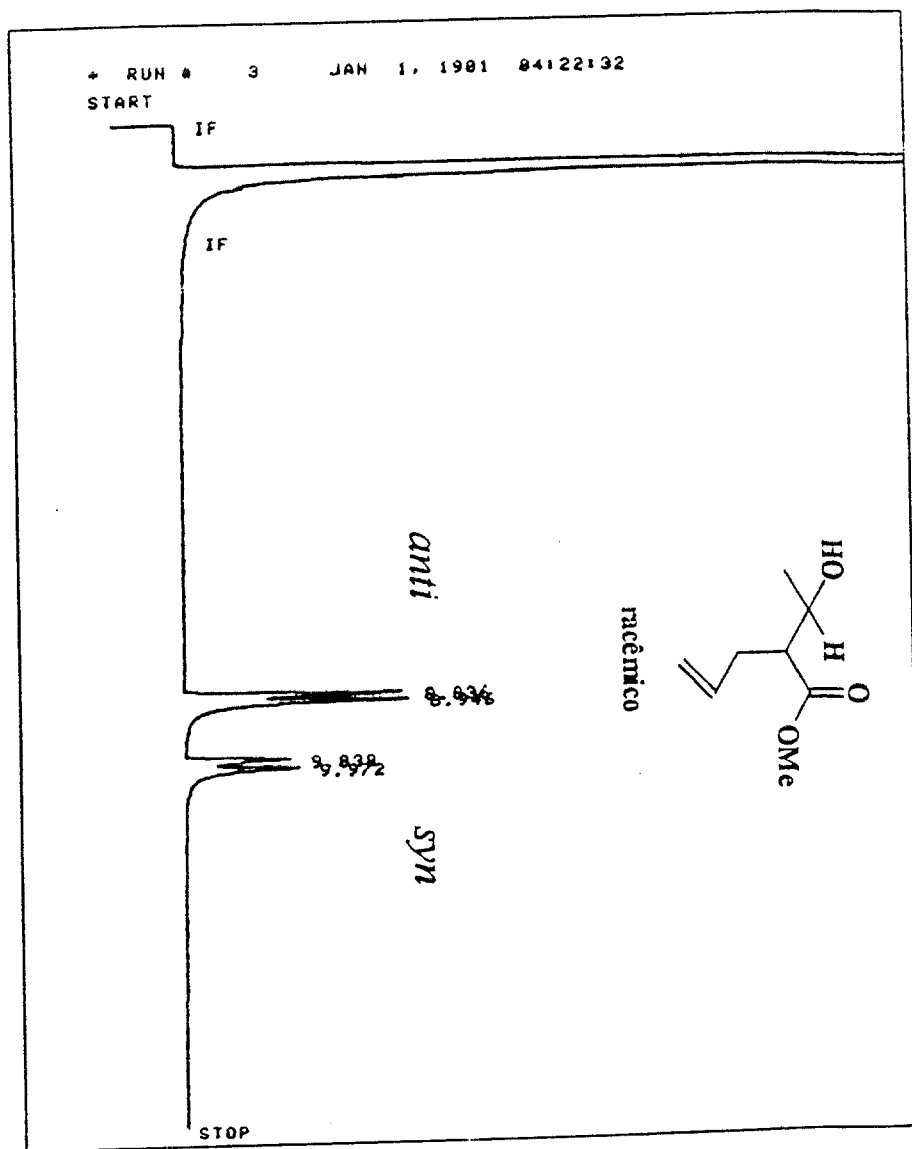
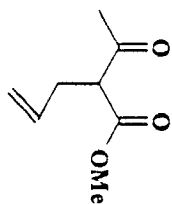


FIG-3

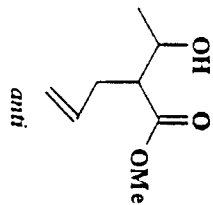
* RUN # 21 JAN 2, 1981 04:43:43
START

IF

IF

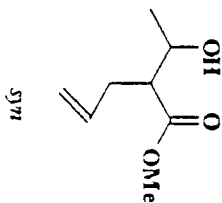


8.942



8.832

9.799



E/G-4

RESUMO

"PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE *Serratia rubidaea* CCT 5732 EM ÓXIDO MISTO DE SÍLICA-TITÂNIA", caracterizado pelo fato de compreender a preparação do óxido binário $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ adicionando-se 12,1 mL de solução de HNO_3 $0,85 \text{ mol.L}^{-1}$ em uma solução de 123 mL de etanol e 123 mL de tetraetil-ortossilicato (TEOS), deixou-se esta solução sob refluxo e agitação por 2,5 h à temperatura de 80°C , sendo que a esta solução foi adicionado 487 mL de etanol e 34 mL de tetrabutóxido de titânio (IV) (TBOT); a mistura foi agitada por mais 2 h à temperatura ambiente, e 66,4 mL de solução de HNO_3 $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$ foram adicionados lentamente, sendo que o produto foi deixado em repouso para gelificar; o gel formado foi quebrado e colocado em estufa a 110°C por 24 h, sendo a seguir, o produto triturado e peneirado em peneira de $250 - 75 \mu\text{m}$, permitindo que partículas com diâmetros entre $250 - 75 \mu\text{m}$ fossem selecionadas; em uma outra etapa do presente processo, o óxido binário de $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ foi lavado com solução aquosa de ácido nítrico 1 mol.L^{-1} , depois com água bidestilada e seco na estufa a 60°C por 24 h; o excesso de água foi retirado na linha de vácuo (10^{-5} torr), sendo que, para eliminação da matéria orgânica, a matriz foi calcinada a 500°C com fluxo de ar.